

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

10/632.187 11.88.03

PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation⁷ : A61P 35/00, A61K 31/135, 31/66, 31/575</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/33917</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. Juni 2000 (15.06.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/03952</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 6. Dezember 1999 (06.12.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 55 953.4 4. Dezember 1998 (04.12.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ZEISIG, Reinhard [DE/DE]; Schwedter Strasse 49, D-10435 Berlin (DE). FICHTNER, Iduna [DE/DE]; Amselstrasse 7, D-13125 Berlin (DE). ARNDT, Dietrich [DE/DE]; Petershagener Weg 19, D-12589 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p style="text-align: center;">Veröffentlicht</p> <p><i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: AGENTS PROVIDED FOR TREATING TUMORS, BASED ON LIPOSOMES, AND CONTAINING TAMOXIFEN</p> <p>(54) Bezeichnung: MITTEL ZUR TUMORTHAPIE AUF LIPOSOMENBASIS DIE TAMOXIFEN ENTHALTEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a pharmaceutical agent based on a combination of antiestrogen, alkyl phospholipid and phospholipids, and to the production and use thereof. The invention can be used in fields of medicine and in the pharmaceutical industry. The invention is characterized by the combination of alkyl phospholipid, said alkyl phospholipid being effective in an antineoplastic manner, and of an antiestrogen in a lipid vesicle. A preferred example is octadecyl-(N,N-dimethylpiperidine-4-yl)-phosphate (OPP), and tamoxifen (Tam) in phosphocholine (PC) vesicles.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft ein pharmazeutisches Mittel auf der Basis einer Kombination von Antiöstrogen, Alkylphospholipid und Phospholipiden, seine Herstellung und Verwendung. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie. Wesentliches Merkmal der Erfindung ist die Kombination von antineoplastisch wirksamen Alkylphospholipid und einem Antiöstrogen in einem Lipidvesikel. Ein bevorzugtes Beispiel ist Octadecyl-(N,N-dimethylpiperidin-4-yl)-phosphat (OPP), Tamoxifen (Tam) in Phosphocholin (PC)-Vesikeln.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

MITTEL ZUR TUMORTHERAPIE AUF LIPOSOMENBASIS DIE TAMOXIFEN ENTHALTEN

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein pharmazeutisches Mittel auf der Basis einer Kombination von Antiöstrogen, Alkylphospholipid und Phospholipiden, seine Herstellung und Verwendung. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

In der medikamentösen Tumorthherapie ist vielfach durch das Auftreten von Resistenz gegen das Pharmakon und durch toxische Nebenwirkungen eine optimale Behandlung behindert. Ein Teil dieser unerwünschten Effekte läßt sich durch Verkapseln der Medikamente in Liposomen aufheben, bzw. mindern (D. D. Lasic und D. Papahadjopoulos, Medical Applications of Liposomes, Elsevier, 1998). Liposomale Anthrazykline haben das Stadium der erweiterten klinischen Anwendung erreicht. Besondere Vorteile ergeben sich, wenn zur Liposomenbildung Phospholipide mit inhärenter Antitumorwirkung benutzt werden, z.B. Alkylphospholipide (Arndt et al. Drugs of Today 1998, 34, 83-96).

Alkylphospholipide sind neuartige Verbindungen, deren Wirkung gegen das Tumorstadium durch Effekte auf die Zellmembran zustande kommt (Alkylphosphocholines: An update, Drugs of Today, Vol. 34, Suppl. F, 1998). Unter bestimmten Bedingungen ergeben Alkylphospholipide supramolekulare Strukturen, u.a. Liposomen, mit günstigeren Eigenschaften im Vergleich zur monomeren, bzw. micellaren Verbindung (DE 41 32 345 A1, DE 44 08 011 C1). In diese Liposomen mit inhärenter Antitumorwirkung können weitere Substanzen mit antineoplastischer Aktivität eingeschlossen werden (Arndt et al., Breast Cancer Res. Treatm. 43 (1997) 237-246, DE 44 08 011 C1).

Mammakarzinome, der häufigste Tumor der Frau, lassen sich in ca. 75% der Fälle durch endokrine Maßnahmen beeinflussen. Dabei hat insbesondere die kompetitive Hormontherapie mittels Tamoxifen Bedeutung, bei der am Rezeptor die endogenen Hormone antagonisiert werden. Die nebenwirkungsarme Tamoxifen-Behandlung wird jedoch durch die Entwicklung von Resistenz gegen das Pharmakon eingeschränkt. Ursachen der Resistenz sind u.a. Veränderungen am Ligand und dessen Bindung an den Östrogenrezeptor (ER), Verlust oder Veränderung des ER, Veränderungen von Transkriptionsfaktoren oder des ER-assoziierten Proteins oder die Blockierung durch Antiöstrogen-Bindungsproteine (Katzenellenbogen et al., Breast Cancer Res. Treat. 44 (1997) 23-38; Osborne, New Engl. J. Med. 339 (1998) 1609-18; US005904930A).

Ziel der Erfindung ist die Schaffung einer Arzneimittelzusammensetzung auf der Basis von Antiöstrogen, Alkylphospholipid und Phospholipiden, das in Antiöstrogen-resistenten Tumoren wirksam ist, bzw. die Resistenzentwicklung minimiert oder verhindert.

Die Erfindung wird durch den Hauptanspruch charakterisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Wesentliches Merkmal der Erfindung ist die Kombination von antineoplastisch wirksamen Alkylphospholipid und einem Antiöstrogen in einem Lipidvesikel. Ein bevorzugtes Beispiel ist Octadecyl-(N,N-dimethylpiperidin-4-yl)-phosphat (OPP), Tamoxifen (Tam) in Phosphocholin (PC)-Vesikeln.

Im einzelnen ist das erfindungsgemäße Mittel durch folgende Zusammensetzung charakterisiert:

- ein Alkylphospholipid (mit antineoplastischer Wirksamkeit)
- ein wasser- oder lipidlösliches Antiöstrogen mit antineoplastischer Wirksamkeit
- ein antineoplastisch inertes Phospholipid
- ggf. Cholesterol oder ein anderes geeignetes Sterol
- ggf. ein Lipid mit positiver oder negativer Oberflächenladung
- ggf. ein polyethylenglycolmodifiziertes Lipid (PEG-Lipid)
- ggf. weitere Wirkstoffe und pharmazeutisch übliche Träger- und Hilfsstoffe.

Als Phospholipid-Analoga werden Alkylphospholipide mit Antitumorwirkung der allgemeinen Struktur I eingesetzt.

Struktur I:

R-Y-P-X

In dieser Formel bedeuten

R: einen Alkyl-, Alkenyl-, oder Alkynylrest mit 12 bis 22 C-Atomen

Y: Sauerstoff, Schwefel oder CH₂

P: Phosphatgruppe (PO₂)

X: einen Cholin- oder modifizierten Cholinrest, oder Serin-,

Ethanolamin-, Glycerin-gruppen, oder synthetische

Modifikationen dieser Gruppen wie die Piperidin-4-yl-Gruppe

Bevorzugte Verbindungen sind Hexadecylphosphocholin, Octadecylphosphocholin, Erucylphosphocholin, Octadecyl-[2-(N-methylpiperidinio)ethyl]-phosphat, Octadecylphosphoethanolamin und Hexadecylphososerin.

Das mit den Phospholipid-Analogen assoziierte wasser- oder lipidlösliche Antiöstrogen wird durch Tamoxifen, Droloxifene, Toremifene, Idoxifene, Raloxifene, Miproxifene-Phosphat (TAT-59), ICI 1643,384, ICI 182,780 und die Hauptmetabolite des Tamoxifens, 4-Hydroxytamoxifen und N-Desmethyltamoxifen, repräsentiert.

Phospholipide ohne eigenen antineoplastischen Effekt sind Lipide aus natürlichen Quellen oder synthetischer Herkunft wie sie üblicherweise zur Liposomenherstellung verwendet werden, z.B. Phosphatidylcholin.

Als PEG-Lipid wird bevorzugt polyethylenglycolmodifiziertes Phosphatidylethanolamin im Molekulargewichtsbereich von 1000 - 6000 Dalton eingesetzt. Es eignen sich unter anderem 1,2-Distearoyl-s,n-glycero-3-phosphoethanolamin-N-polyethylenglycol, MG~2700; (PEG₂₀₀₀DSPE) und 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-polyethylenglycol, MG~5750 (PEG₅₀₀₀DPPE). Vorteilhaft ist auch der Einsatz von Verbindungen, die gleichzeitig PEG-Lipid und antineoplastisch wirksames Phospholipid-Analoges sind, wie Hexadecylphosphoethanolamin-N-polyethylenglycol.

Die liposomale Form besteht bevorzugt aus einschichtigen oder mehrschichtigen Vesikeln oder die Liposomen liegen als "reverse evaporation vesicles" vor.

Die resistenzüberwindende Wirkung des erfindungsgemäßen Mittels läßt sich in vitro und in vivo belegen.

Das erfindungsgemäße Mittel zur Tumorthherapie ist pharmazeutisch stabil, physiologisch hervorragend verträglich und insbesondere zur intravenösen Applikation geeignet. Unerwünschter Metabolismus der Antiöstrogene wird vermieden, bzw. vermindert, es wird eine verbesserte Resorption und Verteilung des Pharmakons erreicht. In Wasser schwerlösliche Antiöstrogene sind in liposomaler Form gut applizierbar.

Das Mittel ist deshalb für eine Anwendung in der Tumorthherapie hervorragend geeignet.

Die Erfindung wird durch folgende Beispiele erläutert:

Beispiel 1:

4,62 mg Octadecyl-(1,1-dimethyl-piperidino-4-yl)-phosphat (OPP; 10 µmol), 0,387 mg Z-4-Hydroxy-Tamoxifen (HO-Tam, 1 µmol), 1,55 mg Cholesterol (4 µmol), und 1,1 mg Dicetylphosphat (DCP; 2 µmol) werden in 25 ml Chloroform/Methanol (7/3; v/v) vollständig gelöst, und dann das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer vollständig abgedampft. Der erhaltene, fein verteilte Lipidfilm wird mit 1 ml phosphatgepufferter Kochsalslösung (PBS, pH 7,4) resuspendiert, nach Zugabe von einigen Glasperlen mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur auf der Schüttelmaschine intensiv bewegt. Die erhaltene Suspension aus multischichtigen Vesikel (MLV) wird dann durch Polykarbonatfilter, Porendurchmesser 100 nm mit einem LiposoFast Basis-System (Avestin, Inc. Ottawa, Canada) mehrfach extrudiert, bis Vesikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser um 100 nm mit einer unimodalen Größenverteilung und einem Polydispersitätsindex kleiner 0,2 (Dynamische Lichtstreuungsmessung, DLS) erhalten werden.

Der Gehalt an OPP, HO-Tam, CH und DCP wird mittels HPTLC kontrolliert. Es werden etwa 85 % der Ausgangsmenge erhalten. Die Liposomen sind in der Zusammensetzung

gegenüber der Ausgangszusammensetzung (Abweichung < 5%) unverändert. Diese HO-Tam-Liposomen werden vorzugsungsweise für in vitro-Untersuchungen eingesetzt.

Beispiel 2:

36 mg OPP, 72 mg Tamoxifen-Citrat (Tam), 144 mg Phosphatidylcholin (PC) und 8,5 mg DCP werden in 100 ml Chloroform/Methanol (7/3; v/v) vollständig gelöst, und dann das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer vollständig abgedampft. Der erhaltene, fein verteilte Lipidfilm wird mit 12 ml Zitronensäure/Phosphat-Puffer (pH 6.08) resuspendiert, nach Zugabe von einigen Glasperlen mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur auf der Schüttelmaschine intensiv bewegt. Es wird eine MLV-Suspension erhalten; die heterogen in ihrer Größenzusammensetzung ist mit Vesikeldurchmesser zwischen 100 und 5000 nm.

Diese Tam-Liposomen werden vorzugsungsweise für in vitro-Untersuchungen und als Ausgangsliposomen für Vesikel definierter Größe eingesetzt.

Beispiel 3

36 mg OPP, 72 mg Tamoxifen-Citrat (Tam), 144 mg Phosphatidylcholin (PC) und 8,5 mg DCP und zusätzlich 9,7 mg N-(O-methyl-polyethylenglycol)-1,2-distearyl-s,n-glycero-3-phosphoethanolamin (PEG₂₀₀₀DSPE) werden in 100 ml Chloroform/Methanol (7/3; v/v) vollständig gelöst, und dann das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer vollständig abgedampft. Der erhaltene, fein verteilte Lipidfilm wird mit 12 ml Zitronensäure/Phosphat-Puffer (pH 6.08) resuspendiert, nach Zugabe von einigen Glasperlen mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur auf der Schüttelmaschine intensiv bewegt. Es wird eine MLV-Suspension erhalten; die heterogen in ihrer Größenzusammensetzung ist mit Vesikeldurchmesser zwischen 100 und 5000 nm. Diese Tam-Liposomen werden vorzugsungsweise für in vitro-Untersuchungen und als Ausgangsliposomen für Vesikel definierter Zusammensetzung eingesetzt.

Beispiel 4:

Tam-MLV aus Beispiel 2 werden durch Polykarbonatfilter, Porendurchmesser 200 nm mit einem LiposoFast Basis-System (Avestin, Inc. Ottawa, Canada) mehrfach extrudiert, bis eine unimodale Größenverteilung um 180 nm mit einem Polydispersitätsindex kleiner 0,35 (Dynamische Lichtstreuungsmessung, DLS) erhalten wird.

Der Gehalt an OPP, Tam, CH und DCP wird mittels HPTLC kontrolliert. Es wird eine Liposomensuspension erhalten, die etwa 75 % an eingesetztem Tam und 98 % an OPP enthält. Darüber hinaus sind die Liposomen in der Zusammensetzung gegenüber der Ausgangszusammensetzung (Abweichung < 5%) unverändert. Die Tam-Liposomen werden vorzugsungsweise für in vivo Untersuchungen eingesetzt.

Beispiel 5:

Peg-Tam-MLV aus Beispiel 3 werden durch Polykarbonatfilter, Porendurchmesser 200 nm mit einem LiposoFast Basis-System (Avestin, Inc. Ottawa, Canada) mehrfach extrudiert, bis eine unimodale Größenverteilung um 185 nm mit einem Polydispersitätsindex kleiner 0,33 (Dynamische Lichtstreuungsmessung, DLS) erhalten wird.

Der Gehalt an OPP, Tam, DCP und Peg₂₀₀₀DSPE wird mittels HPTLC kontrolliert. Es wird eine Liposomensuspension erhalten, die etwa 75 % an eingesetztem Tam und 98 % an OPP enthält. Darüber hinaus sind die Liposomen in der Zusammensetzung gegenüber der Ausgangszusammensetzung (Abweichung < 5%) unverändert. Die Peg-Tam-Liposomen werden vorzugsweise für in vivo Untersuchungen eingesetzt.

Beispiel 6:

HO-Tam-Liposomen aus Beispiel 1 werden mit RPMI-Medium mit 10% fötales Kälberserum (ohne Indikatorzusatz, mit Adriamycin/Streptomycin), so verdünnt, daß eine Konzentration von 200 nmol/ml an OPP eingestellt ist, die dann weiter seriell verdünnt wird bis zu 0,78 nmol/ml. Die Konzentration an Wirkstoff HO-Tam beträgt dann entsprechend 20 nmol/ml bis 0,08 nmol/ml.

Die Brustkrebszellen MCF7, die sensitiv gegenüber Tamoxifen, sind und MCF7-R, die gegenüber dem Antiöstrogen resistent sind, werden in Mikrotiterplatten zu 2×10^4 Zellen/well eingesät und am darauffolgenden Tag mit HO-Tam-Liposomen, Kontrollliposomen der Zusammensetzung wie die HO-Tam-Liposomen, jedoch ohne HO-Tam, HO-Tam, gelöst in DMSO und DMSO in gleicher Menge, wie zum Lösen des HO-Tam benötigt wird, für 3 Tage inkubiert. Danach werden die Überstände abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen, und dann die Zellwachstumshemmung mit dem MTT-Assay bestimmt. Dazu werden die Zellen mit 200 µl MTT-Lösung (4,6-Dimethylthiozol-2-yl-2,5-diphenyl-tetrazolium; 0,5 mg/ml) bei 37°C für 4 Stunden inkubiert, 170 µl des Überstandes vorsichtig abgehoben und die ausgefallenen Formasankristalle mit einer 70% Isopropanol-Lösung durch intensives Pipettieren und Schütteln vollständig in Lösung gebracht. Anschließend werden die Mikrotiterplatten photospektroskopisch bei 540 nm vermessen und die Wachstumshemmung im Vergleich zum Wachstum unbehandelter Zellen berechnet. Man erhält eine Wachstumshemmung, die im Bild 1 wiedergegeben ist.

Beispiel 7:

Für die in vivo-Testung werden Tam-Liposomen nach Beispiel 4 eingesetzt. Als Tumormodell wird der Brustkrebs 3366/Tam auf weibliche NMRI-Nude-Mäusen transplantiert und die Behandlung begonnen, wenn der Tumor fühlbar ist. Die Tiere erhalten 2 x wöchentlich eine Dosis Liposomen mit 50 mg/kg Tam (und entsprechend 25 mg/kg OPP) über 4 Wochen. Als Kontrollen werden Liposomen verabreicht, die kein Tam enthalten, und außerdem noch eine Gruppe mit freiem Tam behandelt. Das Tumorstadium im Verhältnis

zur Kontrollgruppe (Physiologische Kochsalzlösung) wird bestimmt und als T/C Wert prozentual in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Therapeutische Wirksamkeit von Tamoxifen-Liposomen gegenüber dem resistenten Brustkrebstumor 3366/Tam

Gruppe	Substanz	Dosis Tam/Lipid	Körpergewichts- veränderung		T/C
		mg/kg/Injektion	% (Tag 29/51)	%	%
A	Lösungsmittel		3		
B	Tamoxifen	50/0	-5		91
C	Tamoxifen-Liposomen	50/25	-5		63*
D	Kontroll-Liposomen	0/25	-4		88

* Signifikant verschieden zu Tamoxifen und zur Lösungsmittelkontrolle ($p < 0,05$)

Patentansprüche

1. Mittel zur Tumorthherapie auf Liposomenbasis enthaltend:
 - ein Alkylphospholipid mit antineoplastischer Wirksamkeit
 - ein oder mehrere wasser- oder lipidlösliche Antiöstrogene mit antineoplastischem Effekt, das oder die mit dem Alkylphospholipid in liposomaler Form assoziiert ist (sind).
 - ein Phospholipid ohne antineoplastische Wirksamkeit
 - ggf. Cholesterol oder ein anderes geeignetes Sterol.
 - ggf. ein Lipid mit positiver oder negativer Ladung
 - ggf. ein polyethylenglycolmodifiziertes Lipid (PEG-Lipid)
 - pharmazeutisch übliche Träger- und Zusatzstoffe.
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Alkylphospholipid Verbindungen der allgemeinen Struktur I eingesetzt werden,

Struktur I:**R-Y-P-X**

wobei bedeuten:

R: einen Alkyl-, Alkenyl-, oder Alkynylrest mit 12 bis 22 C-Atomen

Y: Sauerstoff, Schwefel oder CH₂

P: Phosphat (PO₂)

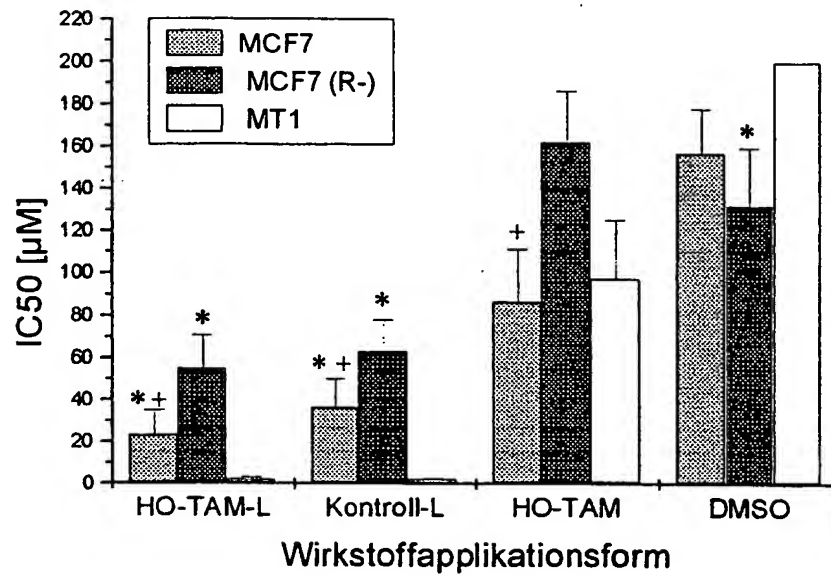
X: einen Cholin- oder modifizierten Cholinrest, oder Serin-, Ethanolamin-, Glycerin-gruppen, oder synthetische Modifikationen dieser Gruppen wie die Piperidin-4-yl-Gruppe.

3. Mittel nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß bevorzugt Hexadecylphosphocholin, Octadecylphosphocholin, Erucylphosphocholin, Octadecyl-[2-(N-methylpiperidino)ethyl]phosphat, Octadecylphosphoethanolamin und Hexadecylphosphoserin verwendet werden.
4. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als weitere antineoplastisch wirksame Substanzen, die mit dem Alkylphospholipid in liposomaler Form assoziiert sind, Antiöstrogene wie Tamoxifen, Droloxifen, Toremifene, Idoxifene, Raloxifene, Miproxifene-Phospat (TAT-59), ICI 164,3384, ICI 182,780 und die Hauptmetabolite des Tamoxifens, 4-Hydroxytamoxifen, N-Desmethyltamoxifen einschließlich neuer, bisher noch nicht beschriebener Antiöstrogene verwendet werden.

5. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein antineoplastisch inertes Lipid natürlichen oder synthetischen Ursprungs als Basislipid für die Membranbildung eingesetzt wird wie Phosphocholin, -serin, -ethanolamin, -glycerol oder andere ähnliche Lipide, wobei das Verhältnis Lipid zum Antiöstrogen 0-10 : 1 (m/m) beträgt.
6. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Cholesterol oder ein anderes geeignetes Sterol wie Sitosterol enthalten ist und das Sterol zum Alkylphospholipid im Molverhältnis 0-1 : 1 steht.
7. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein polyethylen-glycolmodifiziertes Lipid (PEG-Lipid), vorzugsweise N-(O-methoxy-polyethylenglycyl)-1,2-distearyl-s,n-glycero-3-phosphoethanolamin (PEG₂₀₀₀-DSPE), zugesetzt wird.
8. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es als erste antineoplastisch wirksame Substanz OPP und als weitere antineoplastisch wirksame Substanz Tamoxifen enthält und ggf. ein weiteres inertes Phospholipid zugesetzt wird.

1/1

Bild 1: Zytotoxischer Effekt von Tamoxifen-Liposomen auf Brustkrebszellen



1×10^5 Zellen/ml wurden mit den entsprechenden Liposomen (L), HO-TAM/DMSO bzw. mit DMSO für 3 Tage inkubiert. Die lebenden Zellen wurden mit dem MTT-Assay bestimmt. Angegeben ist die Konzentration an Wirkstoff, die notwendig ist, um das Zellwachstum zu 50 % zu hemmen (IC_{50}).

*: Signifikant verschieden zu HO-TAM; + : signifikant verschieden zu MCF7(R-).

In International Application No
PCT/DE 99/03952

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>R. ZEISIG: "Increase of the antitumor effect of liposomal octadecyl-piperidinoyl-phosphate: influence of composition on the final effect"</p> <p>HTTP://WWW.MICROB.UNI.WROC.PL/BIOCHEM/ZEISIG.HTM, 'Online! XP002136791</p> <p>Retrieved from the Internet:</p> <p><URL:http://www.microb.uni.wroc.pl/biochem/zeisig.htm> 'retrieved on 2000-04-27!</p> <p>the whole document</p>	1-8
X	<p>EP 0 359 981 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH)</p> <p>28 March 1990 (1990-03-28)</p> <p>page 3, line 5-10</p> <p>page 3, line 26; claims 5,7; examples 6,7;</p> <p>table 1</p>	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

• Special categories of cited documents :

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *¹ later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *² document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *³ document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *⁴ document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 May 2000

Date of mailing of the international search report

15/05/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer _____

Gonzalez Ramon, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/03952

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,Y	WO 99 59599 A (MEDMARK PHARMA GMBH ;NAGLER APOLLONIA (DE)) 25 November 1999 (1999-11-25) abstract; claim 1	1-8
E	WO 00 01392 A (MEDMARK PHARMA GMBH ;NAGLER APOLLONIA (DE)) 13 January 2000 (2000-01-13) page 8, line 10-20 page 15 -page 16	1-8
Y	EP 0 152 379 A (CIBA GEIGY AG) 21 August 1985 (1985-08-21) page 13, line 5,6; claim 5	1-8
Y	DE 44 08 011 C (MAX DELBRUECK CT FUER MOLEKULA) 2 November 1995 (1995-11-02) abstract	1-8
Y	MAYER, LAWRENCE D. ET AL: "The role of tumor-associated macrophages in the delivery of liposomal doxorubicin to solid murine fibrosarcoma tumors" J. PHARMACOL. EXP. THER. (1997), 280(3), 1406-1414 , XP000905641 abstract; figures 3,4,7; table 1	1-8
Y	SPRUSS T. ET AL: "Antitumor activity of miltefosine alone and after combination with platinum complexes on MXT mouse mammary carcinoma models." JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND CLINICAL ONCOLOGY, (1993) 119/3 (142-149). , XP000905599 abstract	1-8
Y	BERGER M. R. ET AL: "Structure activity relationships if iv injectable alkylphosphocholines" PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH,US,PHILADELPHIA, AACR, vol. MEETING 87, 1996, page 387 XP000853551 ISSN: 0197-016X abstract	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/03952

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0359981	A	28-03-1990	DE 3827974 A	22-02-1990
			AT 91903 T	15-08-1993
			AU 627207 B	20-08-1992
			AU 3955089 A	22-02-1990
			CA 1330035 A	07-06-1994
			DD 283938 A	31-10-1990
			DK 401089 A	19-02-1990
			ES 2058420 T	01-11-1994
			HU 52396 A	28-07-1990
			IE 64635 B	09-08-1995
			IL 91343 A	14-05-1996
			JP 2108636 A	20-04-1990
			NZ 230323 A	26-05-1992
			PT 91470 A	08-03-1990
			US 5578590 A	26-11-1996
			US 5770593 A	23-06-1998
			ZA 8906287 A	30-05-1990
WO 9959599	A	25-11-1999	DE 19822509 A	25-11-1999
WO 0001392	A	13-01-2000	NONE	
EP 0152379	A	21-08-1985	AU 588798 B	28-09-1989
			AU 3875385 A	22-08-1985
			CA 1246446 A	13-12-1988
			DK 68585 A	16-08-1985
			ES 540372 D	01-06-1986
			ES 8607906 A	16-11-1986
			JP 60190710 A	28-09-1985
			ZA 8501111 A	25-09-1985
DE 4408011	C	02-11-1995	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 99/03952

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 A61P35/00 A61K31/135 A61K31/66 A61K31/575		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 A61P A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	R. ZEISIG: "Increase of the antitumor effect of liposomal octadecyl-piperidinoyl-phosphate: influence of composition on the final effect" HTTP://WWW.MICROB.UNI.WROC.PL/BIOCHEM/ZEISIG.HTM, 'Online! XP002136791 Retrieved from the Internet: <URL:http://www.microb.uni.wroc.pl/biochem/zeisig.htm> 'retrieved on 2000-04-27! das ganze Dokument	1-8
X	EP 0 359 981 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 28. März 1990 (1990-03-28) Seite 3, Zeile 5-10 Seite 3, Zeile 26; Ansprüche 5,7; Beispiele 6,7; Tabelle 1	1-8
-/-		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Abschließungsdatum des internationalen Recherchenberichts
2. Mai 2000		15/05/2000
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Gonzalez Ramon, N

Formblatt PCT/ISA210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/03952

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, Y	WO 99 59599 A (MEDMARK PHARMA GMBH ;NAGLER APOLLONIA (DE)) 25. November 1999 (1999-11-25) Zusammenfassung; Anspruch 1	1-8
E	WO 00 01392 A (MEDMARK PHARMA GMBH ;NAGLER APOLLONIA (DE)) 13. Januar 2000 (2000-01-13) Seite 8, Zeile 10-20 Seite 15 -Seite 16	1-8
Y	EP 0 152 379 A (CIBA GEIGY AG) 21. August 1985 (1985-08-21) Seite 13, Zeile 5,6; Anspruch 5	1-8
Y	DE 44 08 011 C (MAX DELBRUECK CT FUER MOLEKULA) 2. November 1995 (1995-11-02) Zusammenfassung	1-8
Y	MAYER, LAWRENCE D. ET AL: "The role of tumor-associated macrophages in the delivery of liposomal doxorubicin to solid murine fibrosarcoma tumors" J. PHARMACOL. EXP. THER. (1997), 280(3), 1406-1414, XP000905641 Zusammenfassung; Abbildungen 3,4,7; Tabelle 1	1-8
Y	SPRUSS T. ET AL: "Antitumor activity of miltefosine alone and after combination with platinum complexes on MXT mouse mammary carcinoma models." JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND CLINICAL ONCOLOGY, (1993) 119/3 (142-149). , XP000905599 Zusammenfassung	1-8
Y	BERGER M. R. ET AL: "Structure activity relationships of iv injectable alkylphosphocholines" PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, PHILADELPHIA, AACR, Bd. MEETING 87, 1996, Seite 387 XP000853551 ISSN: 0197-016X Zusammenfassung	1-8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/03952

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0359981 A	28-03-1990	DE 3827974 A AT 91903 T AU 627207 B AU 3955089 A CA 1330035 A DD 283938 A DK 401089 A ES 2058420 T HU 52396 A IE 64635 B IL 91343 A JP 2108636 A NZ 230323 A PT 91470 A US 5578590 A US 5770593 A ZA 8906287 A	22-02-1990 15-08-1993 20-08-1992 22-02-1990 07-06-1994 31-10-1990 19-02-1990 01-11-1994 28-07-1990 09-08-1995 14-05-1996 20-04-1990 26-05-1992 08-03-1990 26-11-1996 23-06-1998 30-05-1990
WO 9959599 A	25-11-1999	DE 19822509 A	25-11-1999
WO 0001392 A	13-01-2000	KEINE	
EP 0152379 A	21-08-1985	AU 588798 B AU 3875385 A CA 1246446 A DK 68585 A ES 540372 D ES 8607906 A JP 60190710 A ZA 8501111 A	28-09-1989 22-08-1985 13-12-1988 16-08-1985 01-06-1986 16-11-1986 28-09-1985 25-09-1985
DE 4408011 C	02-11-1995	KEINE	

